

**ESTUDO HISTOQUÍMICO DE MUÇOSSUBSTÂNCIAS E PROTEÍNAS NO
PRODUTO DE SECREÇÃO DA GLÂNDULA DE HARDER DE
METACHIRUS NUDICAUDATUS (MARSUPIALIA-MAMMALIA)**

**HISTOCHEMICAL STUDY OF MUCOSUBSTANCE AND
PROTEINS IN THE HARDERIAN GLAND OF
METACHIRUS NUDICAUDATUS (MARSUPIALIA-MAMMALIA)**

RECEBIDO EM 18/05/77

APROVADO EM 27/06/77

JOSÉ RENAN V. DA COSTA *
RUBERVAL A. LOPES **
SÁLUA IUCIF ***

INTRODUÇÃO

As glândulas lacrimal e de Harder, que são relacionadas com os olhos, segundo Sundwall (12), desenvolveram-se a partir de uma mesma origem, e, na seqüência evolutiva dos vertebrados, quando eles trocaram o ambiente aquático pelo terrestre, essas glândulas sofreram uma diferenciação histológica e fisiológica. A presença da glândula de Harder já foi demonstrada na maioria dos vertebrados (ver revisões de Kühnel (4) e de Valeri et al. (13). Entretanto, não se verificou, na literatura, qualquer referência sobre estudos histoquímicos do produto de secreção dessa glândula em marsupiais. É, pois, o objetivo do presente trabalho estudar, por meio de técnicas adequadas, as mucossustâncias e proteínas da glândula de Harder de *Metachirus nudicaudatus*.

* Aluno do Curso de Pós-Graduação na Área de Morfologia-Biologia Celular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto — USP.

** Prof. Assistente Doutor do Departamento de Ciências Patológicas da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto — USP.

*** Prof. Livre Docente do Departamento de Morfologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto — USP.

MATERIAL E MÉTODOS

No presente estudo foram utilizadas cuicas, capturadas no município de Ribeirão Preto (SP). Os animais foram sacrificados por inalação de éter anestésico e as glândulas de Harder foram retiradas e, imediatamente, imersas em líquido de Bouin. Após fixação, durante 24 horas, as peças foram incluídas em parafina.

Para a observação histológica da glândula de Harder da cuica foram utilizadas as técnicas comumente empregadas em histologia, como a da hematoxilina + eosina e tricômica de Masson.

Para o estudo histoquímico das mucossustâncias e proteínas usaram-se as recomendações técnicas de Pearse (10), a menos que citada referência especial. Os métodos para mucossustâncias, foram os seguintes: ácido periódico + reativo de Schiff (PAS), azul de alcian a pH = 2,5, segundo Mowry (9) e azul de alcian + PAS.

Como controles, utilizaram-se os seguintes métodos: amilase salivar (os cortes foram mantidos na estufa a 37°C, em câmara úmida durante duas horas, renovando-se a saliva depois de uma hora), acetilação, tratamento pela tripsina (Parenzyme — Moura Brasil e Orlando Rangel S.A., a 0,025 mg/ml, em solução tampão fosfato 0.1M a pH = 7,0, por 60 minutos, à temperatura de 37°C), tratamento pelo clorofórmio + metanol 1:1, a 37°C, durante 6 horas.

Os métodos para proteínas foram os seguintes: azul de bromofenol (indicativa), ninhidrina-Schiff para radical α -amino, ferricianeto férrico para radical sulfidríla, tioglicolato-ferricianeto férrico para radical dissulfeto, ácido perfórmico + azul de alcian para radical cistina, técnica de Millon para tirosina, paradimentilaminobenzoaldeído para radical triptofano e amarelo naftol-S para radical arginina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da detecção histoquímica de mucossustâncias e proteínas acham-se expressos na tabela I.

O produto de secreção da glândula de Harder de **Metachirus nudicaudatus** corou-se em vermelho pelo método do PAS. Após a ação da amilase salivar e do clorofórmio + metanol, não houve modificação na intensidade da coloração. Tal resultado indica a presença de mucossustância neutra, que é PAS — positiva, McManus (7), já que a amilase digere o glicogênio possivelmente presente nesse produto de secreção, Lison (5); e o clorofórmio + metanol extrai qualquer fração lipídica presente. Após a ação da tripsina houve

uma diminuição na intensidade da coloração, uma vez que esta enzima digere os radicais protéicos. Após a acetilação não houve coloração, e tal fato indica o bloqueio dos radicais vic-glicóis, confirmando, assim, a presença de mucossustância neutra na glândula, McManus & Cason (8) (Fig. 2).

TABELA I

Resultados Histoquímicos de Mucossustâncias e Proteínas do Produto de Secreção da Glândula de Harder da Cuica.

Reação	Resultado
PAS	+++
PAS + amilase	+++
PAS + tripsina	+
PAS + clorofórmio + metanol	+++
PAS + acetilação	-
Azul de alcian pH = 2,5	-
Azul de alcian + PAS	vermelho
Azul de bromofenol (indicativa)	+++
Ninhidrina - Schiff (α - amino)	+
Ferricianeto férrico (- SH)	-
Tioglicolato - ferricianeto férrico (S-S)	+
Ácido perfórmico + azul de alcian (cistina)	-
Millon (tirosina)	+
P - dimetilaminobenzoaldeído (triptofano)	-
Amarelo naftol - S (arginina)	+

Com o emprego do método do azul de alcian a pH = 2,5 o produto de secreção da glândula de Harder da cuica, não apresentou qualquer coloração, não havendo, portanto, mucossustância ácida carboxilada ou sulfatada no mesmo.

A presença de proteínas nessa glândula foi detectada, quando da reação positiva do azul de bromofenol, que é indicativa para radicais protéicos em geral (Fig. 3); como também por ocasião da diminuição da coloração pelo PAS após tratamento pela tripsina. Com a metodologia empregada foi possível identificar os seguintes radicais: α - amino, dissulfeto, tirosina e arginina.

Histologicamente a glândula de Harder da cuica é constituída de ácinos grandes apresentando células baixas, com núcleos recha-

çados para o polo basal, e luz ampla repleta de produto de secreção (Fig. 1).

Embora presente na maioria dos vertebrados, com exceção dos primatas e do homem, a função da glândula de Harder é assunto de controvérsia em algumas espécies e, em particular, nos marsupiais. Para alguns autores, sua função é bem específica e sugerem que ela seja chamada "glandula nictitans", Shinoda (11), enquanto que, para outros, sua função é considerada não perfeitamente determinada, Aureli (1).

Loewenthal (6) relacionou a glândula de Harder com a membrana nictitante. Essa membrana, segundo Kingsley (3), sofreu involução em muitos mamíferos, reduzindo-se a um rudimento que é chamada "prega semilunar". Walls (cit. em 2) relatou o fato de ser a glândula de Harder responsável pela lubrificação do olho, e não a lacrimal, nas espécies cuja membrana nictitante estava ausente, substituída pela membrana transparente.

CONCLUSÕES

A glândula de Harder de **Metachirus nudicaudatus** é constituída de ácinos grandes, irregulares, os quais apresentam células baixas, com núcleos basais e luz ampla preenchida por produto de secreção. Esse produto de secreção é constituído de um complexo glico-protêico contendo mucossubstância neutra e radicais protêicos α -amino, dissulfeto, tirosina e arginina.

RESUMO

Os autores estudaram histoquimicamente as mucossubstâncias e proteínas da glândula de Harder de **Metachirus nudicaudatus**. Baseados nos resultados, os autores concluíram que o produto de secreção dessa glândula é constituído de um complexo glico-protêico contendo mucossubstância neutra e radicais protêicos α -amino, dissulfeto, tirosina e arginina.

PALAVRAS CHAVE: **Metachirus nudicaudatus**, glândula de Harder, mucossubstâncias, proteínas.

SUMMARY

The mucosubstances and proteins of the harderian gland of the **Metachirus nudicaudatus** were studied histochemically. From their experimental results the authors concluded, that the harderian gland of

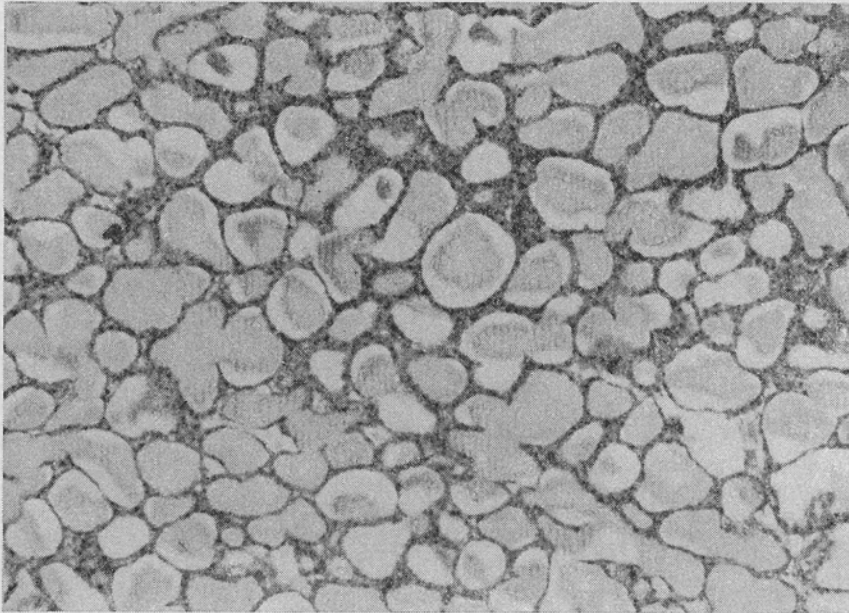


FIG. 1 — Aspecto histológico da glândula de Harder da cuica, evidenciando ácinos constituídos de células baixas e luz ampla repleta de produto de secreção. Hematoxilina + eosina (200 X).

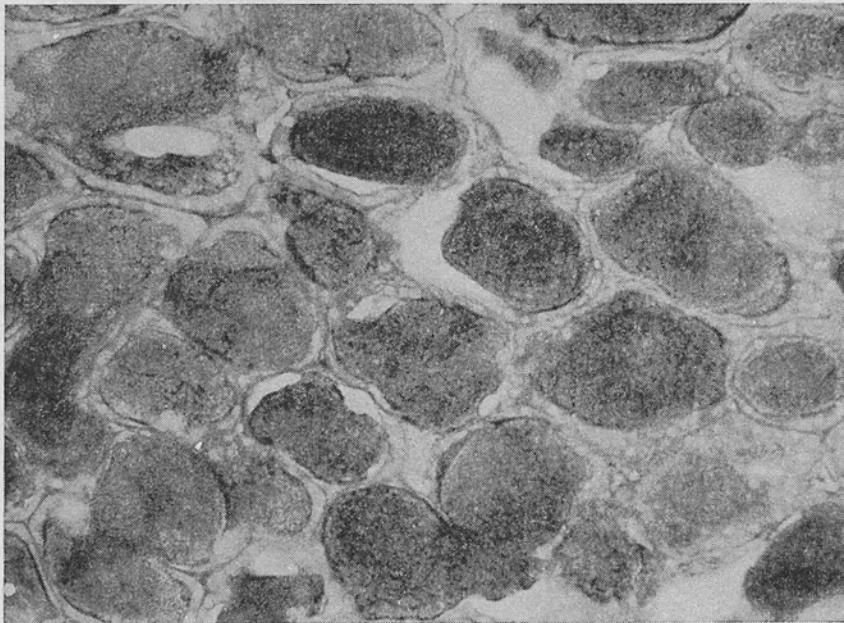


FIG. 2 — Aspecto histológico da glândula de Harder da cuica, evidenciando produto de secreção PAS — positivo. Ácido periódico + reativo de Schiff (580 X).

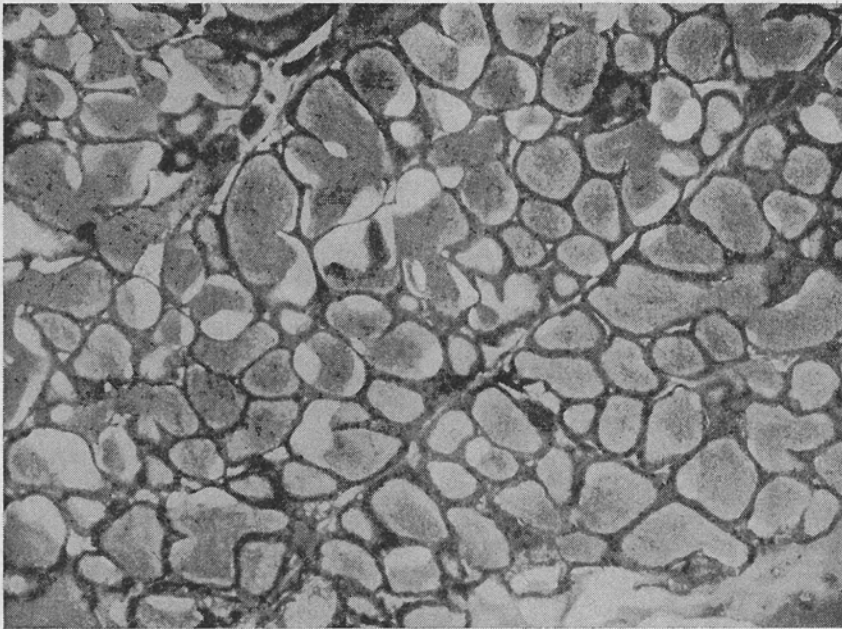


FIG. 3 — Glândula de Harder da cuica repleta de produto de secreção, corado pelo azul de bromofenol (200 X).

the cuica show neutral mucosubstances and protein radicals α -amine, S-S groups, tirosine, and arginine.

KEY WORDS: **Metachirus nudicaudatus**, harderian gland, mucosubstance, protein.

RÉSUMÉ

Les mucosubstances et les protéines de la glande de Harder de **Metachirus nudicaudatus** ont été étudiées suivant les techniques histo-chimiques. Les résultats obtenus montrent que le produit de sécrétion de cette glande comprend un complexe gluco-protéinique contenant la mucosubstance neutre et des radicaux protéiques α -aminés, des substances sulfatées, de la tyrosine et de l'arginine.

MOTS CLÉS: **Metachirus nudicaudatus**, glande de Harder, mucosubstances, protéines.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — AURELI, G. La ghiandola di Harder nel maiale. *Riv. Istoch. norm. patol.*, Milano, **3** (2-3): 113-126, 1957.
- 2 — BELLAIRS, A.D.A. & BOYD, J.D. The lachrymal apparatus in lizards and snakes I. The brille, the orbital glands, lachrymal canaliculi and origin of the lachrymal duct. *Proc. Zool. Soc. Lond.*, London, **117** (1): 81-108, 1947.
- 3 — KINGSLEY, J. S. *Comparative anatomy of vertebrates*, John Murray, London, 1912.
- 4 — KÜHNEL, W. Struktur and Cytochemie der Harderschen Drüse Von Kaninchen. *Z. Zellforsch.*, Berlin, **119** (3): 384-404, 1971.
- 5 — LISON, L. *Histochimie et Cytochimie Animales*, 3^e éd., Gauthier-Villars, Paris, 1960.
- 6 — LOEWENTHAL, N. Notes sur les glandes de l'orbite des reptiles. *C. R. Assoc. Anat.*, Paris, **30**(2): 304-336, 1935.
- 7 — MCMANUS, J.F.A. Histological demonstration of mucin after periodic acid. *Nature*, London, **158** (4006): 202, 1946.
- 8 — MCMANUS, J.F.A. & CASON, J. E. Carbohydrate histochemistry studied by acetylation techniques. 1. Periodic acid methods. *J. Exp. Med.*, New York, **91** (6): 651-654, 1950.
- 9 — MOWRY, R. W. Alcian blue technics for the histochemical study of acidic carbohydrates. *J. Histochem. Cytochem.*, Baltimore, **4**, (5): 407, 1965.
- 10 — PEARSE, A. G. E. *Histochemistry: Theoretical and Applied*. 3rd ed. Churchill London, 1958.
- 11 — SHINODA, S. Harder's gland in some mammals. *Biol. Abstract*, Philadelphia, **36**: ref. 1170, 1961.
- 12 — SUNDWALL, J. The lachrymal gland. *Am. J. Anat.*, Philadelphia, **20** (2): 148-235, 1916.
- 13 — VALERI, V.; LOPES, R. A.; MIGLIORINI, R. H.; CAMARGO, A.C.M. Lipids in the harderian gland of the guinea-pig (*Cavia porcellus*). *Ann. D'Histochimie*, Paris, **18** (4): 301-310, 1973.